



10/069889

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 27 SEP. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

191

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☒

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

15 SEP. 1999
9911793

L-1

15 SEP. 1999

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET GERMAIN & MAUREAU

BP 6153

69466 LYON CEDEX 06

n° du pouvoir permanent : références du correspondant : téléphone :
MD/MK/B05B3454FR/A 0472698430

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

PROCÉDE DE DETECTION DE L'EXPRESSION D'UNE PROTEINE D'ENVELOPPE D'UN RETROVIRUS
ENDOGENE HUMAIN ET UTILISATIONS D'UN GENE CODANT POUR CETTE PROTEINE

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

BIO MERIEUX

Forme juridique

S.A.

Nationalité (s)

Française

Adresse (s) complète (s)

Chemin de l'Orme

69280 MARCY L'ETOILE

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

FRANCE

99 11141

1er Septembre 99

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande

n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

Mireille DIDIER

CPI 971202

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

D. GRAUD

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

[Signature]

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDEICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
p. 7, 13				14.04.00	20 AVR. 2000 - V D
p. 33			✓	14.04.00	20 AVR. 2000 - V D
p. 33			✓	03.07.00	10 JUIL. 2000 - V D

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

DÉPARTEMENT DES BREVETS

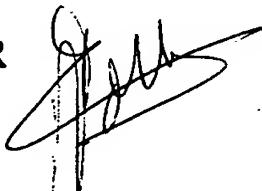
26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 2.
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B05B3454FR/A MD/DGR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		99 11793	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Procédé de détection de l'expression d'une protéine d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain et utilisations d'un gène codant pour cette protéine			
LE(S) DEMANDEUR(S) : CABINET GERMAIN & MAUREAU BP 6153 69466 LYON CEDEX 06			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		MALLET	
Prénoms		François	
Adresse	Rue	84 Rue Anatole France	
	Code postal et ville	69100	VILLEURBANNE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		COSSET	
Prénoms		François-Loïc	
Adresse	Rue	30 Grande Rue de la Guillotière	
	Code postal et ville	69007	LYON
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		BLOND	
Prénoms		Jean-Luc	
Adresse	Rue	75 Bis rue des Aqueducs	
	Code postal et ville	69005	LYON
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Mireille DIDIER CPI 971202 	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08


Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 2..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B05B3454FR/A MD/DGR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		99 11793	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Procédé de détection de l'expression d'une protéine d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain et utilisations d'un gène codant pour cette protéine			
LE(S) DEMANDEUR(S) : CABINET GERMAIN & MAUREAU BP 6153 69466 LYON CEDEX 06			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		LAVILLETTE	
Prénoms		Dimitri	
Adresse	Rue	8 Rue de Bourtibourg	
	Code postal et ville	10290	BERCENAY LE HAYER
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		BOUTON	
Prénoms		Olivier	
Adresse	Rue	48 Avenue du Chater	
	Code postal et ville	69430	FRANCHEVILLE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		RUGGIERI	
Prénoms		Alessia	
Adresse	Rue	27 Rue du Puits	
	Code postal et ville	68100	MULHOUSE
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Mireille DIDIER CPI 971202 	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Les rétrovirus sont des virus enveloppés qui portent des spicules glycoprotéiques codées par les virus à leur surface. Ces glycoprotéines d'enveloppe sont synthétisées sous la forme de précurseurs polyprotéiques (Pré-env) qui sont ensuite clivés par des protéases cellulaires en protéine de surface mature (SU) et en protéine transmembranaire (TM). Les glycoprotéines d'enveloppe sont impliquées dans l'entrée des virus dans les cellules hôte. Elles reconnaissent spécifiquement et se lient à des récepteurs de surface cellulaire et sont nécessaires pour la fusion de l'enveloppe virale et des membranes cellulaires de l'hôte. Le récepteur et l'enveloppe sont des molécules multamériques ou oligomériques. Pour tous les virus enveloppés, les interactions des glycoprotéines d'enveloppe avec le ou les récepteur(s) cellulaire(s) conduisent à des réarrangements conformationnels de l'enveloppe nécessaires à l'exposition du peptide de fusion. La fusion a lieu à la surface de la cellule ou dans des vésicules cellulaires suivant la voie d'endocytose du virion. De plus, pour permettre l'entrée du virus, une fusion médiée par les protéines de surface virales peut, dans certaines conditions, provoquer une fusion cellule à cellule avec pour résultat la formation de cellules multinucléées géantes ou syncytia. La formation de syncytia est réalisée par au moins deux voies : un virion peut simultanément fusionner avec deux cellules, on parle alors de fusion "from without", ou une cellule infectée qui exprime les glycoprotéines d'enveloppe à sa surface peut fusionner avec une cellule adjacente (fusion "from within").

Les déterminants de l'enveloppe et la séquence des événements causant les changements conformationnels de l'enveloppe lors des processus de fusion "from without" sont bien documentés pour les orthomyxovirus qui nécessitent un environnement acide des vésicules d'endocytose pour leur entrée (Skehel, J. J. et al., PNAS, 79 :968-972 (1982)). Pour les rétrovirus, pour lesquels la voie d'entrée est indépendante du pH, les déterminants précis et les étapes, menant de la reconnaissance du récepteur à l'activation de la fusion ne sont pas encore élucidés. D'autres rétrovirus sont connus pour induire une fusion cellule à cellule ("fusion from within"), tels que le virus de la leucémie féline, le virus de la tumeur mammaire de la souris, le virus de la réticuloendothéliose aviaire, VIH et SIV.

Par ailleurs, Fefferey S. Jones et Rex Risser (Journal of Virology, Janv. 1993, p 67-74) ont montré que les glycoprotéines d'enveloppe du virus de la leucémie

murine écotope (MuLV) de type sauvage, sous la dépendance du LTR viral, étaient capables d'induire la formation de syncytia dans des cellules de rat XC en l'absence de virion (fusion "from within").

De la connaissance des inventeurs, il n'a jamais été montré de pouvoir
 5 fusogène, dans un processus de fusion "from within", des glycoprotéines d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain.

Des auteurs ont bien émis l'hypothèse que l'enveloppe rétrovirale endogène de ERV3, un rétrovirus endogène humain proche de MLV (Moloney Leukemia Virus), pouvait être impliquée *in vivo* dans l'élaboration du placenta via un
 10 processus de fusion (Patrick J. W. Venables et al., Virology, 211, 589-592 (1995)) mais ce phénomène n'a jamais été démontré *in vitro*. D'autre part, les études sur le polymorphisme de *env* ERV3, sur des individus d'origine caucasienne, ont permis de mettre en évidence la présence d'une mutation dans la région (SU) de l'enveloppe ERV3 générant un codon stop précoce présent à l'état homozygote dans 1% de la
 15 population étudiée, sans que ces individus présentent d'anomalie de la grossesse ou du développement placentaire (Nathalie de Parseval et Thierry Heidmann, Journal of Virology, Vol ; 72, N° 4, pages 3442-3445 (1998)), mettant ainsi en cause l'hypothèse précédemment émise.

Les présents inventeurs ont maintenant mis en évidence *in vitro* que la
 20 glycoprotéine d'enveloppe de HERV-W non modifiée, exprimée sous la dépendance d'un promoteur, de préférence un promoteur hétérologue, possède des propriétés fusogènes.

HERV-W est une famille de rétrovirus endogènes humains multi-copie récemment décrite, dénommée ainsi en raison de l'homologie entre le site de fixation de
 25 l'amorce de la transcription inverse et celui des rétrovirus aviaires utilisant l'ARNt Trp. Aucune entité compétente pour sa réplication n'a été mise en évidence. La fonctionnalité d'une région promotrice a été vérifiée et, parmi différents tissus humains sains testés, son expression semble être restreinte au placenta par Northern Blot (J. L. Blond et al., Journal of Virology, Vol. 73, N° 2, pages 1175-1185 (1999)). Un cadre ouvert de
 30 lecture unique codant pour une enveloppe rétrovirale potentiellement fonctionnelle existe sur le chromosome 7. Un clone ADNc correspondant vraisemblablement à un

transcrit sous génomique et portant la séquence de l'enveloppe complète a été isolé à partir de matériel placentaire (clone cl.PH74, GenBank AF072506, dont la séquence est identifiée par SEQ ID NO :2). Les études phylogénétiques effectuées au niveau protéique indiquent que la protéine d'enveloppe est de type D. La séquence
 5 SEQ ID NO :2 donnée en fin de description correspond donc à la séquence nucléotidique en ADNc complète du clone cl.PH74 dont la séquence protéique est identifiée par SEQ ID NO :1.

Env HERV-W possède tous les "attributs" d'une enveloppe rétrovirale : en particulier, un peptide leader, les deux sous unités caractéristiques SU et TM
 10 séparées par un site de clivage par les furines et, au niveau de sa TM, elle possède un peptide de fusion hydrophobe, une région immunosuppressive et une région carboxyl transmembranaire suivie d'une queue cytoplasmique longue. L'expression de Env HERV-W a été mise en évidence dans le placenta.

Les expériences réalisées par les inventeurs montrent que Env HERV-W
 15 entraîne, par fusion de cellule à cellule, la formation de syncytia dans différentes lignées cellulaires testées d'origine humaine et simienne. Le phénomène de fusion observé est dépendant de la reconnaissance de récepteur(s) spécifique(s), comme montré de manière directe lors de transfections et de manière indirecte lors de co-cultures des cellules transfectées avec d'autres types cellulaires. Les présents inventeurs ont par ailleurs
 20 identifié le récepteur spécifique de Env HERV-W par une approche de compétition s'appuyant sur la propriété d'interférence des enveloppes rétrovirales, en bloquant des récepteurs cellulaires par une protéine d'enveloppe autre que Env HERV-W, empêchant ainsi la formation de syncytia. Le récepteur identifié par les présents inventeurs est le récepteur hATB^o des rétrovirus mammifères de type D exprimé dans les cellules
 25 humaines (Rasko E. J. et al. PNAS, 1999, 96 : 2129-2134 et Tailor C. S. et al. J. Virol., 1999, 73(5) : 4470-4474). L'utilisation de ce récepteur, dont le procédé de mise en évidence est décrit dans un des exemples, fait également partie de la présente invention.

Aussi la présente invention a pour objet un procédé de détection de l'expression d'une protéine ou d'un polypeptide d'enveloppe d'un rétrovirus endogène
 30 humain, selon lequel la protéine ou le polypeptide présente une séquence polypeptidique qui comprend la séquence SEQ ID NO :1 ou un fragment de SEQ ID NO :1, ou une

séquence présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80 %, de préférence au moins 90% ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1 ou avec un fragment de SEQ ID NO :1, et selon lequel on détecte le pouvoir fusogène de ladite protéine ou dudit fragment dans des cellules d'un tissu cellulaire ou d'une culture cellulaire, par la mise en évidence de la formation de syncytia.

Un autre objet de l'invention est un procédé de détection de l'expression d'une protéine ou d'un polypeptide d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain, selon lequel la protéine ou le polypeptide présente une séquence polypeptidique présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80 %, de préférence au moins 90% ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1, et selon lequel on détecte le pouvoir fusogène de ladite protéine dans des cellules d'un tissu cellulaire, ou d'une culture cellulaire par la mise en évidence de la formation de syncytia.

Selon l'invention, ladite protéine ou ledit polypeptide présente une séquence polypeptidique qui comprend la séquence SEQ ID NO :1 ou un fragment de SEQ ID NO :1, ou une séquence présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95%, d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1 ou avec un fragment de SEQ ID NO :1.

Il est bien entendu selon la présente invention, que ladite protéine ou ledit polypeptide, ou leurs dits fragments, s'ils ne présentent pas une identité complète avec SEQ ID NO :1 ou ses fragments, doivent posséder un pouvoir fusogène, de préférence au moins égal ou supérieur à celui de SEQ ID NO :1 ou ses fragments.

Si les fragments de la protéine ou du polypeptide de l'invention présentent une identité complète avec les fragments de SEQ ID NO :1, alors la taille de ces fragments peut être inférieure à 20 acides aminés, par exemple elle peut être d'environ 10 acides aminés, voire d'environ 5 acides aminés.

Les variations prévues selon l'invention dans la séquence polypeptidique de la protéine ou du polypeptide ou de leurs fragments comprennent les variations liées au polymorphisme, mais aussi les modifications telles que substitution(s), délétion(s) et addition(s) susceptibles d'être apportées à ladite séquence polypeptidique pour obtenir une protéine, un polypeptide ou un fragment de ceux-ci possédant un pouvoir fusogène, en particulier au moins égal ou supérieur à celui de SEQ ID NO :1 ou ses fragments.

L'analyse du polymorphisme peut être réalisée par la méthode SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism), qui est une méthode électrophorétique permettant d'objectiver, à l'aide de différences de migration, la présence d'au moins une mutation discriminant deux séquences courtes (inférieures à 250 pb). Ainsi, comme
 5 illustré à la figure 4, après amplification sur ADN total à l'aide des amorces U6198 et L6186 ou U 6189 et L6186, il est possible d'analyser le polymorphisme de l'enveloppe localisée sur le chromosome 7 à l'aide du jeu d'amorces représenté (U6302 à L6321), permettant de générer un ensemble de 10 fragments chevauchants de taille adéquate. Le polymorphisme de l'un des sous-fragments peut également être mis en évidence par des
 10 techniques de séquençage, de cartographie de restriction le cas échéant, ou plus simplement par une technique d'hybridation sandwich de type ELOSA permettant de discriminer jusqu'à une mutation ponctuelle (Cros P. et al., demande de brevet européen EP 0 486 661).

Des exemples de séquences Env HERV-W polymorphes sont représentées
 15 à la figure 1 annexée, les séquences ADN correspondantes étant représentées à la figure 2. Ces figures représentent l'alignement de séquences protéiques et nucléiques obtenues par séquençage de clones issus de trois individus différents.

Par ailleurs, le polymorphisme du LTR qui dirige la transcription du gène *env* situé sur le chromosome 7 a été étudié. On observe deux groupes de LTRs 5' dont
 20 les séquences nucléiques obtenues par séquençage de deux clones provenant de deux individus différents sont représentées et alignées dans la figure 3.

Un choix judicieux d'amorces a permis d'amplifier spécifiquement sur le chromosome 7, à partir d'ADN humain total, un fragment nucléique contenant l'intégralité de l'information U3RU5-gag-pol-env-U3RU5 à l'aide des amorces U6198, L6186 ou exclusivement la séquence env-U3RU5 à l'aide des amorces U6189, L6186.
 25 Une telle approche est par exemple possible en utilisant une amorce chevauchant la zone de jonction entre la séquence rétrovirale (U3 en amont, U5 en aval) et la séquence flanquante non rétrovirale contiguë. Par, exemple, l'amorce L6186 chevauche la région U5 3' terminale et la séquence non rétrovirale avale. A partir d'un tel produit de PCR
 30 isolant la séquence d'intérêt du mélange des séquences HERV-W présentes dans le génome humain, il est possible de réaliser une analyse du polymorphisme.

De manière préférentielle, ladite protéine présente au moins l'une des caractéristiques suivantes :

- elle est codée par le gène *env* du rétrovirus endogène HERV-W ;
 - elle est codée par un cadre de lecture ouvert situé sur le chromosome 7
- 5 du génome humain ;
- elle présente une séquence polypeptidique qui comprend la séquence SEQ ID NO :1, ou une séquence présentant pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95% d'identité avec la SEQ ID NO :1. De préférence, elle consiste en SEQ ID NO:1.

10 Les cellules dudit tissu ou de ladite culture cellulaire dans lesquelles on recherche à mettre en évidence le pouvoir fusogène sont avantageusement choisies parmi les cellules osseuses, les cellules musculaires, les cellules placentaires, les cellules endothéliales, en particulier des vaisseaux sanguins, les cellules épithéliales, les cellules

15 Comme cela sera illustré dans un des exemples qui suit, la détection du pouvoir fusogène de ladite protéine peut être mise en œuvre selon au moins l'un quelconque des deux protocoles suivants.

Selon un premier protocole, on obtient un vecteur d'expression de ladite protéine à partir duquel l'expression de la protéine ou de son gène est sous la

20 dépendance d'un promoteur, de préférence un promoteur fort ; on transfecte des cellules par le vecteur obtenu pour obtenir des cellules productrices, exprimant à leur surface ladite protéine ; et on observe la formation de syncytia ou l'absence de formation de syncytia.

Selon un second protocole, on obtient un vecteur d'expression de ladite

25 protéine à partir duquel l'expression de la protéine ou de son gène est sous la dépendance d'un promoteur, de préférence un promoteur fort ; on transfecte des cellules par le vecteur obtenu pour obtenir des cellules productrices, exprimant à leur surface ladite protéine ; on co-cultive des cellules naïves indicatrices exprimant à leur surface un récepteur de ladite protéine en présence desdites cellules productrices ; et on observe la

30 formation de syncytia ou l'absence de formation de syncytia.

La présente invention concerne en outre l'utilisation d'un gène ou d'un acide nucléique ou d'un fragment de gène ou d'un acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis précédemment dans la description des procédés objets de l'invention, dans des conditions appropriées permettant son expression, pour préparer une composition thérapeutique ou prophylactique.

Un autre objet de l'invention est une composition thérapeutique ou prophylactique comprenant un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis précédemment.

Une telle composition peut comprendre en outre un promoteur hétérologue ou autologue, de préférence hétérologue, pour l'expression de ladite protéine ou dudit polypeptide.

L'invention concerne aussi les objets suivants :

- un vecteur d'expression comprenant au moins un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis précédemment, et des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte ;

- une cellule hôte comprenant au moins un vecteur d'expression de l'invention, et

- une composition thérapeutique ou prophylactique comprenant au moins un vecteur d'expression ou une cellule hôte de l'invention.

Les différentes compositions thérapeutiques de l'invention sont en particulier destinées au traitement de cancers, tel que par destruction des cellules cancéreuses au moyen de la formation de syncytia. Les différentes compositions prophylactiques de l'invention sont notamment destinées à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta.

Les compositions de l'invention thérapeutiques ou prophylactiques, telles que définies ci-dessus, sont avantageusement destinées à un traitement communément dénommé « traitement par thérapie génique » ou « traitement par transfert de gène ».

Comme énoncé ci-dessus, les propriétés fusogènes de la protéine Env HERV-W, du polypeptide Env HERV-W ou de leurs fragments tels que définis dans la

présente invention trouvent notamment une application dans le domaine de la thérapie génique des cancers.

A ce jour les gènes les plus fréquemment utilisés dans la thérapie contre les cancers sont (i) les gènes qui codent pour des protéines qui augmentent
5 l'immunogénicité des cellules tumorales, telles que les cytokines pro-inflammatoires, (ii) les gènes qui codent pour des enzymes qui rendent les cellules cancéreuses sensibles à un pro-médicament dans des systèmes gène/pro-drogue, tels que le système thymidine kinase du virus Herpes Simplex/Ganciclovir ou le système cytosine désaminase/5FC.

De manière idéale, le transfert de gènes thérapeutiques devrait conduire à la
10 fois à une destruction locale des cellules cancéreuses, à l'activation de l'immunité anti-tumorale pour éliminer les zones tumorales auxquelles les gènes thérapeutiques ne peuvent être délivrés et le traitement ne devrait pas causer de dommages aux tissus cellulaires normaux de l'hôte, en particulier aux tissus des organes vitaux.

La protéine ou le polypeptide de l'invention qui comprend ou consiste en la
15 protéine Env HERV-W ou ses fragments, ou en une séquence polypeptidique présentant pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90% ou encore au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO :1, sous la dépendance d'un promoteur hétérologue ou autologue capable d'induire son expression répond aux critères définis ci dessus via la formation de syncytia. Ces syncytia se forment à partir de
20 cellule(s) transfectée(s) par un processus de fusion de cellule à cellule.

Dans un mode de réalisation en vu d'optimiser ses caractéristiques thérapeutiques, le polypeptide de l'invention est éventuellement fusionné avec d'autres protéine(s) ou fragment(s) de protéine(s), même si intrinsèquement il répond aux critères définis précédemment. Le polypeptide de l'invention est capable d'induire la formation
25 de syncytia à un pH voisin de la neutralité ou à pH neutre. Typiquement le vecteur d'expression ou plasmide sera adapté pour permettre l'expression du polypeptide induisant la formation de syncytia, de telle sorte que lorsqu'il est exprimé le polypeptide puisse induire la fusion des cellules transfectées avec d'autres cellules humaines non transfectées. Il est souhaitable que la protéine ou le polypeptide de l'invention soit
30 exprimé indépendamment d'autres composants viraux, à moins que ceux ci soient utiles à la vectorisation.

Aussi, la présente invention a pour objet un gène ou un acide nucléique, ou un fragment de gène ou d'un acide nucléique, recombinant codant pour un polypeptide de l'invention qui induit la formation de syncytia par fusion de cellules transformées et de cellules malignes cibles et son utilisation dans le domaine de la thérapie de maladies malignes, telles que les cancers.

L'invention concerne également une méthode de traitement d'une maladie maligne chez un patient qui consiste à administrer au patient le gène ou un acide nucléique, ou un fragment de gène ou d'un acide nucléique, recombinant codant pour une protéine ou un polypeptide de l'invention qui induit la formation de syncytia par fusion de cellules transformées et de cellules malignes cibles.

Le gène ou l'acide nucléique, ou le fragment de gène ou d'acide nucléique est introduit *in vitro* dans des cellules humaines appropriées, telles que des cellules de lignées continues immortalisées, par des techniques standards connues de l'homme du métier, telle que transfection, transduction ou transformation, et les cellules ainsi transformées sont ensuite introduites chez le patient où elles peuvent exercer leur propriétés fusogènes.

Le gène ou l'acide nucléique, ou le fragment de gène ou d'acide nucléique de l'invention peut être utilisé de différentes manières pour le traitement de cancers, en particulier pour le traitement de tumeurs solides ou molles. Les cellules cibles peuvent être transformées *ex vivo* ou *in vivo* par les vecteurs (plasmides) codant pour le polypeptide de l'invention.

Les propriétés fusogènes de la protéine Env HERV-W, du polypeptide Env HERV-W ou de leurs fragments tels que définis dans la présente invention trouvent également une application dans le domaine de la prophylaxie pour prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta et pallier des échecs de grossesse.

Le gène ou l'acide nucléique ou leurs fragments tels que définis dans l'invention peuvent donc être utilisé pour différents effets thérapeutiques ou prophylactiques, le but ultime étant soit (i) de détruire les cellules cibles par formation de syncytia induisant une mort cellulaire des cellules cibles par un processus de mort différent de la mort cellulaire par apoptose, soit (ii) d'induire ou de favoriser la formation de syncytia, par exemple pour pallier une déficience dans la formation des

syncytiotrophoblastes lors de la grossesse, ou pour prévenir une déficience dans la formation naturelle de tout autre type de syncytia, ladite déficience étant associée à une pathologie.

L'invention concerne également l'utilisation de la protéine Env HERV-W ou d'un fragment de Env HERV-W, tels que définis précédemment, à la surface d'un vecteur de thérapie génique comprenant, entre autres, un gène ou une séquence d'acide nucléique ou un oligonucléotide d'intérêt thérapeutique susceptible d'être exprimé dans une cellule cible ou de s'hybrider à une séquence nucléotidique complémentaire d'une cellule cible, ladite protéine Env HERV-W ou ledit fragment de cette protéine interagissant avec son récepteur cellulaire décrit ci-dessus, favorisant ainsi l'introduction du gène ou de la séquence d'acide nucléique ou de l'oligonucléotide d'intérêt thérapeutique dans la cellule cible.

Aussi, l'invention concerne un vecteur de thérapie génique comprenant une protéine ou un polypeptide d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain, ladite protéine ou ledit polypeptide présentant une séquence polypeptidique qui comprend la séquence SEQ ID NO : 1 ou un fragment de SEQ ID NO :1, ou une séquence présentant pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90% ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO :1 ou avec un fragment de SEQ ID NO :1. De préférence, le vecteur de thérapie génique de l'invention comprend la séquence SEQ ID NO :1. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention le vecteur de thérapie génique précédemment cité consiste en un vecteur rétroviral classique de type MLV ou en un vecteur lentiviral pseudotypés par tout ou partie de la protéine d'enveloppe de HERV-W telle que définie ci-dessus, ou encore en un vecteur synthétique portant à sa surface tout ou partie de la protéine Env HERV-W telle que définie ci-dessus conférant les propriétés de ciblage cellulaire et de fusion de la membrane plasmatique.

L'invention concerne encore un vecteur de thérapie génique comprenant à sa surface le récepteur de la protéine identifiée en SEQ ID NO:1, notamment pour cibler des cellules produisant ladite protéine de façon constitutive ou induite.

Les séquences d'acides nucléiques et/ou oligonucléotides d'intérêt thérapeutique (anti-sens ou codant pour une protéine) permettent notamment de cibler les cellules dans lesquelles un gène est exprimé.

Les séquences d'acides nucléiques ou les oligonucléotides anti-sens sont capables d'interférer spécifiquement avec la synthèse d'une protéine cible, par inhibition de la formation et/ou du fonctionnement du polysome, selon le positionnement de l'anti-sens dans l'ARNm de la cible. Donc, le choix fréquent de la séquence entourant le codon d'initiation de la traduction comme cible pour une inhibition par une séquence d'acide nucléique anti-sens ou par un oligonucléotide anti-sens vise à prévenir la formation du complexe d'initiation. D'autres mécanismes dans l'inhibition par des oligonucléotides anti-sens impliquent une activation de la ribonucléase H qui digère les hybrides oligonucléotide anti-sens/ARNm ou une interférence au niveau de sites d'épissage par des oligonucléotides anti-sens dont la cible est un site d'épissage de l'ARNm. Les oligonucléotides anti-sens sont également complémentaires de séquences ADN et peuvent donc interférer au niveau de la transcription par la formation d'une triple hélice, l'oligonucléotide anti-sens s'appariant par des liaisons hydrogène dites de Hoogsteen au niveau du grand sillon de la double hélice d'ADN. Dans ce cas particulier, on parle plus précisément d'oligonucléotides antigènes. Il est bien entendu que les séquences d'acides nucléiques ou oligonucléotides anti-sens peuvent être strictement complémentaires de la cible ADN ou ARN à laquelle ils doivent s'hybrider, mais aussi non strictement complémentaires à la condition qu'ils s'hybrident à la cible. De même, il peut s'agir d'oligonucléotides anti-sens non modifiés ou modifiés au niveau des liaisons inter-nucléotidiques. Toutes ces notions font partie des connaissances générales de l'homme de l'art.

La présente invention concerne donc une composition thérapeutique comprenant, entre autres, un vecteur de thérapie génique, la protéine Env HERV-W ou un fragment de cette protéine telle que définie précédemment, et une séquence d'acide nucléique ou oligonucléotide anti-sens tels que définis ci-dessus.

La protéine Env HERV-W ou un de ses fragments est également utilisé comme vecteur thérapeutique pour le transfert d'un gène d'intérêt thérapeutique dans une cellule cible et dans la formulation d'une composition thérapeutique comprenant au

moins un vecteur de thérapie génique, la protéine Env HERV-W ou un fragment de cette protéine telle que définie précédemment, et un gène d'intérêt thérapeutique ainsi que les éléments permettant l'expression dudit gène d'intérêt thérapeutique. Les gènes d'intérêt thérapeutique peuvent être non mutés ou mutés. Ils peuvent également
 5 consister en des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génome de la cellule cible ou des acides nucléiques stabilisés à l'aide d'agents, tels que la spermine.

Par éléments assurant l'expression dudit gène d'intérêt thérapeutique *in vivo* on fait notamment référence aux éléments nécessaires pour assurer l'expression
 10 dudit gène thérapeutique, après son transfert dans une cellule cible. Il s'agit notamment des séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule, et éventuellement les séquences requises pour permettre l'expression à la surface des cellules cibles d'un polypeptide. Le promoteur utilisé peut être un promoteur viral, ubiquitaire ou spécifique de tissu ou encore un promoteur synthétique. A titre
 15 d'exemple, on mentionnera les promoteurs, tels que les promoteurs des virus RSV (Rous Sarcoma Virus), MPSV, SV40 (Simian Virus), CMV (Cytomegalovirus) ou du virus de la vaccine. Il est en outre possible de choisir une séquence promotrice spécifique d'un type cellulaire donné, ou activable dans des conditions définies. La littérature procure un grand nombre d'informations relatives à de telles séquences
 20 promotrices.

Dans un autre mode de réalisation, on peut utiliser dans une composition thérapeutique une cellule exprimant la protéine Env HERV-W ou un fragment de cette protéine tels que définis précédemment comme véhicule de gène(s) de grande taille grâce aux propriétés fusogènes de la protéine ou de ses fragments qui permettent la
 25 fusion de la cellule vecteur avec une cellule hôte déficitaire pour un ou des gènes déterminé(s), permettant ainsi de compenser le ou les gène(s) déficitaire(s) (exemple : distrophine).

L'invention concerne donc également une telle cellule et son utilisation comme vecteur cellulaire.

30 Les propriétés ou pouvoir fusogène(s) de la protéine ou du polypeptide de l'invention sont également utilisées dans un procédé pour tester l'efficacité et

sélectionner des drogues ou substances médicamenteuses ou des systèmes gène/pro-drogue susceptibles d'intervenir qualitativement et/ou quantitativement sur leur pouvoir fusogène par mise en contact de ladite drogue ou substance médicamenteuse ou dudit système gène/pro-drogue avec des cellules d'une culture cellulaire exprimant ladite protéine ou ledit polypeptide et, observation d'une régression ou d'une disparition dans la formation de syncytia, étant entendu que la formation de syncytia à l'état naturel est associée à un état pathologique. A titre d'exemple, on peut citer les phénomènes hémorragiques, la destruction ou l'altération des cellules neuronales, la destruction ou l'altération exacerbée des ostéoblastes.

10 L'invention concerne aussi un procédé pour la sélection de drogues ou substances médicamenteuses ou de systèmes gène/pro-drogue susceptibles d'intervenir qualitativement et/ou quantitativement sur le pouvoir fusogène d'une protéine ou d'un polypeptide tel que défini précédemment. Selon ce procédé, on met en contact ladite drogue ou substance médicamenteuse ou ledit système gène/pro-drogue avec des
15 cellules d'une culture cellulaire exprimant ladite protéine ou ledit polypeptide et, on observe une régression ou une disparition dans la formation de syncytia.

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins une séquence d'acide nucléique ou d'au moins un oligonucléotide anti-sens répondant aux critères définis précédemment et susceptible de s'hybrider et d'interférer spécifiquement avec la
20 synthèse de la protéine Env HERV-W et une composition thérapeutique comprenant, entre autres, ladite séquence d'acide nucléique ou oligonucléotide anti-sens dans le but d'obtenir *in vivo* une régression ou une disparition de syncytia associés à un état pathologique.

Dans le but d'obtenir *in vivo* une régression de la formation de syncytia ou
25 une disparition de syncytia associés à un état pathologique, on prépare une composition thérapeutique comprenant, entre autres, un ligand susceptible de reconnaître le récepteur identifié précédemment et d'inactiver ou inhiber le processus de formation de syncytia ou une composition comprenant un gène codant pour un ligand susceptible de s'exprimer *in vivo* dans une cellule cible ou dans un tissu cellulaire cible déterminé, ledit
30 gène étant sous la dépendance des éléments nécessaires assurant son expression, après son transfert dans la cellule ou le tissu cellulaire cible.

Ainsi, par ligand on entend toute molécule qui est capable de reconnaître ledit récepteur et/ou d'inhiber sa fonction. Il peut s'agir, entre autres, d'un anticorps monoclonal ou d'un anticorps polyclonal ou d'un fragment d'anticorps monoclonal ou d'anticorps polyclonal. Il peut s'agir également d'une molécule inhibitrice de la fonction du récepteur dont la constante d'affinité serait plus grande que celle de la protéine Env
 5 HERV-W pour sa liaison et fixation au récepteur.

La production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux fait partie des connaissances générales de l'homme du métier. On peut citer à titre de référence Köhler G. et Milstein C. (1975) : Continuous culture of fused cells secreting antibody of
 10 predefined specificity, Nature 256 :495-497 et Galfre G. et al. (1977) Nature, 266 : 522-550 pour la production d'anticorps monoclonaux et Roda A., Bolelli G.F. : Production of high-titer antibody to bile acids, Journal of Steroid Biochemistry, Vol. 13, pp 449-454 (1980) pour la production d'anticorps polyclonaux. Pour la production d'anticorps monoclonaux, un immunogène peut être couplé à de l'hémocyanine de Lymphet Keyhole
 15 (peptide KLH) comme support pour l'immunisation ou à de l'albumine sérique (peptide SA). Les animaux sont soumis à une injection d'immunogène en utilisant de l'adjuvant complet de Freund. Les sérums et les surnageants de culture d'hybridome issus des animaux immunisés sont analysés pour leur spécificité et leur sélectivité en utilisant des techniques classiques, telles que par exemple des tests ELISA ou de Western Blot. Les
 20 hybridomes produisant les anticorps les plus spécifiques et les plus sensibles sont sélectionnés. Des anticorps monoclonaux peuvent également être produits *in vitro* par culture cellulaire des hybridomes produits ou par récupération de liquide d'ascite, après injection intrapéritonéale des hybridomes chez la souris. Quelque soit le mode de production, en surnageant ou en ascite, les anticorps sont ensuite purifiés. Les méthodes
 25 de purification utilisées sont essentiellement la filtration sur gel échangeur d'ions et la chromatographie d'exclusion ou l'immunoprécipitation. Un nombre suffisant d'anticorps sont criblés dans des tests fonctionnels pour identifier les anticorps les plus performants. La production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps, tels que des anticorps chimères produits par génie génétique est bien connue de l'homme
 30 du métier.

Plus particulièrement, par fragment d'anticorps on entend les fragments F(ab)₂, Fab, Fab', sFv (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology 159 : 5821-5833 et Bird et al., 1988, Science 242 : 423-426) d'un anticorps natif et par dérivé on entend, entre autres, un dérivé chimérique d'un anticorps natif (voir par exemple Arakawa et al., 1996, J. Biochem 120 : 657-662 et Chaudray et al., 1989, Nature 339 : 394-397).

Comme évoqué précédemment la thérapie génique ouvre la possibilité d'exprimer *in vivo* de tels ligands par l'administration de compositions thérapeutiques comprenant au moins un gène codant pour un tel ligand. Un tel gène d'intérêt thérapeutique code notamment (i) soit pour au moins un anticorps polyclonal ou monoclonal ou un fragment d'anticorps monoclonal ou polyclonal ou encore pour un anticorps transmembranaire natif, ou un fragment d'un tel anticorps, pour autant que l'anticorps ou fragment d'anticorps soit exprimé *in vivo* à la surface d'une cellule cible ou de cellules cibles d'un tissu et soit capable de reconnaître et de se lier audit récepteur, (ii) soit pour au moins une molécule inhibitrice comme décrit ci-dessus.

Par cellules cibles ou cellules cibles d'un tissu, telles que définies ci-dessus, on entend (i) soit des cellules au niveau desquelles on veut intervenir pour prévenir ou inhiber la formation de syncytia, (ii) soit des cellules autres mais qui sont susceptibles d'exprimer le ligand et par voie de conséquence d'inhiber et/ou de bloquer l'activité fonctionnelle du récepteur.

Par élément assurant l'expression *in vivo* dudit gène, on fait notamment référence aux éléments nécessaires pour assurer son expression, après transfert dans une cellule cible. Il s'agit notamment des séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule et éventuellement des séquences requises pour permettre l'expression à leur surface d'un polypeptide ou d'une molécule inhibitrice, tel qu'évoqué ci-dessus. Le promoteur utilisé peut être un promoteur viral, ubiquitaire ou spécifique de tissu ou encore un promoteur synthétique. Des exemples de tels promoteurs ont été décrits précédemment.

Par anticorps transmembranaire, on entend un anticorps dont au moins la région fonctionnelle capable de reconnaître et de se fixer au récepteur est exprimée à la surface des cellules cibles pour permettre la reconnaissance et la fixation. De tels anticorps peuvent consister en des polypeptides de fusion comprenant une séquence

d'acides aminés définissant la région fonctionnelle et une séquence d'acides aminés définissant un polypeptide transmembranaire qui permet l'ancrage au sein de la bicouche lipidique membranaire des cellules cibles ou à la surface externe de cette bicouche lipidique. Des séquences nucléiques codant pour de tels anticorps transmembranaires sont décrites dans la littérature.

Par gène ou séquence d'acide nucléique ou leurs fragments, on entend (i) un gène ou un acide nucléique natif isolé ou leurs fragments isolés obtenus par coupure enzymatique, ou (ii) un gène ou acide nucléique ou leurs fragments obtenu(s) par synthèse chimique à l'aide de synthétiseurs automatiques, tels que les synthétiseurs commercialisés par la société Applied Biosystems.

Par cellules tumorales, on entend (i) des cellules de lignées cellulaires immortalisées ou (ii) des cellules primaires tumorales prélevées chez un patient.

Par promoteur autologue, on entend un LTR 5' de HERV-W, à la condition qu'il soit fonctionnel et par promoteur hétérologue on entend tout promoteur n'appartenant pas à la famille de HERV-W, d'origine virale, rétrovirale ou cellulaire, éventuellement modifié, à la condition qu'il soit fonctionnel. Avantagusement, le promoteur autologue ou hétérologue est un promoteur fort c'est-à-dire qu'il est capable d'induire une expression quantitativement importante de la protéine ou du polypeptide.

Le pouvoir fusogène de Env HERV-W peut également être utilisée pour favoriser le processus d'adhésion cellulaire dans le cas de greffes hétérologues ou homologues ou dans un processus de réparation cellulaire.

Exemple 1 :

Lignées cellulaires:

La lignée TELCeB6 (Cosset et al., Journal of Virology, 69 (12) : 7430-7436 (1995)) dérive de la lignée TELac2 après transfection et sélection clonale d'un plasmide d'expression destiné à produire des protéine Gag et Pol de type MoMLV (virus de la leucémie murine de Moloney). La lignée TELac2 dérive initialement des cellules humaines de rhabdomyosarcome TE671 (ATCC CRL 8805) et exprime le vecteur rétroviral rapporteur nlsLacZ (Takeuchi et al., Journal of Virology, 68 (12) : 8001-8007

(1994)). La production de particules rétrovirales infectieuses par les cellules TELCeB6 dépend des vecteurs d'expression d'enveloppe transfectés.

Ces cellules sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco modified Eagle medium - Life Technologies) avec 10% de sérum de veau foetal (Life Technologies).
 5 D'une manière générale, ce milieu a été utilisé pour tous les autres types cellulaires, *i.e.* les cellules TE671 (ATCC CRL 8805 - rhabdomyosarcome humain), A-431 (ATCC CRL-1555 - tumeur solide, carcinome épidermoïde humain), HeLa (ATCC CCL-2), COS (ATCC CRL-1651), PAE (cellules endothéliales d'aorte de porc), XC (ATCC CCL-165 - sarcome de rat), NIH-3T3 et QTB (ATCC CRL-1708).

10 Construction des vecteurs d'expression d'enveloppe :

Le plasmide pHCMV a été utilisé pour l'expression de *env* HERV-W. Le plasmide FBASALF-ARless a été utilisé en qualité de témoin positif de fusion; il produit une forme hautement fusogénique de la glycoprotéine d'enveloppe MLV amphotrope, modifiée par introduction d'un codon stop avant le premier acide aminé du peptide
 15 intracytoplasmique p2-R (Rein et al., Journal of Virology, 68 (3) : 1773-1781 (1994)). *env* HERV-W cloné en anti-sens dans le plasmide pHCMV a été utilisé comme témoin négatif.

Transfection et tests de fusion de cellule à cellule (coculture) :

Les plasmides d'expression des glycoprotéines d'enveloppe sont transfectés
 20 dans les cellules TELCeB6 par précipitation au phosphate de calcium (Cosset et al., Journal of Virology, 69 (10) : 6314-6322 (1995)). Les cellules TELCeB6 confluentes exprimant Env sont fixées au Glutaraldéhyde à 0,5% en PBS, 24 h. après transfection. Une coloration par des solutions de May-Grünwald et Giemsa (MERCK) est alors effectuée selon les recommandations du fournisseur. Elle colore les noyaux en violet et
 25 les cytoplasmes en mauve et permet de visualiser les syncytia.

Pour les expériences de coculture, les cellules transfectées sont décrochées du support, comptées puis ré-ensemencées à concentration égale (3×10^5 cellules/puit) en plaques 6 puits. Des cellules fraîches indicatrices sont alors ajoutées aux cellules transfectées à raison de 10^6 cellules par puit et la co-culture est poursuivie pendant
 30 24 h. Une coloration XGal (5-bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside peut

alors être effectuée pour colorer le noyau des cellules TELCeB6 (Cosset et al., Journal of Virology, 69 (10) : 6314-6322 (1995)). Elle est suivie d'une coloration par des solutions de May-Grünwald et Giemsa (MERCK) effectuée selon les recommandations du fournisseur.

5 La majorité des syncytia est observable 18 à 24 heures après le début de la transfection ; le décollement progressif des cellules ne permet plus d'observation, ni de coloration 36 heures après la transfection. La fusion observée correspond à une fusion "from within", c'est-à-dire à une fusion de cellule-à-cellule, à partir d'une cellule exprimant l'enveloppe, par opposition à une fusion "from without" qui correspond à
10 une formation de syncytia consécutive à une fusion virion-cellule(s).

Le tableau I ci-après rassemble les résultats obtenus concernant la capacité de fusion de cellule à cellule de Env HERV-W par transfection directe, comparée à celle de l'enveloppe témoin ARless. Les cellules TELCeB6 et TE671 correspondent à des lignées d'origine humaine. Les cellules COS sont des cellules de rein de singe vert. Les
15 cellules XC sont des cellules de rat.

Tableau I

Enveloppe	index ^a de fusion sur les cellules			
	TELCeB6	TE671	COS	XC
ARless	33	8,6	inn.	40
HERV-W	61	24,7	3,6	0

^aL'index de fusion correspond au pourcentage $(N-S)/T$, où N est le nombre
20 de noyaux en syncytia, S est le nombre de syncytia et T est le nombre total de noyaux comptés. inn. signifie innombrables, organisés en "réseau".

Le tableau I montre que les résultats sont au moins aussi importants pour Env HERV-W que pour le témoin sur les cellules d'origine humaine. Ils sont moindres
25 sur les cellules simiennes. Env HERV-W n'induit pas la formation de syncytia sur des cellules de rat.

Le tableau II ci-après rassemble les données observées dans des expériences de coculture de cellules indicatrices avec des cellules TELCeB6 transfectées par pHCMV-*env* HERV-W. Le type, l'origine et l'espèce des cellules indicatrices sont indiqués. La formation de syncytia est indiquée par les mentions oui/non.

Tableau II

Espèce	Type cellulaire	Origine	Fusion en co-culture avec TELCeB6
Homme	TE671	Rhabdomyosarcome	Oui
	A431	Carcinome épidermoïde	Oui
	HeLa	Carcinome épithélioïde	Oui
Singe	COS	Type fibroblastique	Oui
Porc	PAE	Endothélium	Oui
Rat	XC	Sarcome	Non
Souris	3T3	Fibroblastique	Oui
Caille	QT6	Fibrosarcome	Non

Le tableau II détaille les résultats des expériences de coculture en fonction des lignées cellulaires testées. On observe des syncytia dans des cellules humaines de rhabdomyosarcome (TE671), de carcinome épidermoïde (A431) et de carcinome épithélioïde (HeLa), ainsi que dans des cellules de singe de type fibroblastique (COS), des cellules de porc d'endothélium (PAE) et des cellules de souris de type fibroblastique (3T3). Le fait que l'enveloppe endogène humaine Env HERV-W soit capable de fusionner dans des cellules de porc peut poser des problèmes dans le cadre de la transplantation d'organes (xénotransplantation).

Exemple 2 :

Amplification conjointe puis sélective de la LTR et de l'enveloppe:

Afin d'étudier le polymorphisme de la région codante de l'enveloppe et de la région promotrice U3 de la LTR 5' associée, situées sur le chromosome 7, une

amplification spécifique d'un fragment de 10kb est réalisée grâce à un couple d'amorces spécifiques. En effet, sachant que la famille HERV-W comporte de nombreuses copies non codantes et en particulier un nombre important de LTR, cette stratégie permet d'amplifier spécifiquement et conjointement la région *env* et sa séquence promotrice (LTR5') située en amont, exclusivement sur le chromosome 7. On utilise pour cela une
 5 amorce U6198 s'hybridant sur une séquence spécifique située en amont de la LTR 5' sur le chromosome 7, et une amorce L6186 s'hybridant de façon chevauchante sur la région U5 du LTR 3' et le gène cellulaire adjacent, sur ce même chromosome. La longue PCR (ou LD-PCR) est réalisée dans les conditions suivantes, 1 x 5 min. à 94°C, 10 x (10 sec
 10 à 94°C, 30 sec à 55°C, 8 min. à 68°C), 25 x (10 sec à 94°C, 30 sec à 55°C, 8 min. à 68°C + 10 sec /cycle), 1 x 7 min. à 68°C, en présence de tampon d'amplification (50 mM Tris HCL pH 9,0 à 25°C, 15mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton X-100); 1,5 mM MgCl₂, 0,25mM de chaque dNTP, 330 nM de chaque amorce (U6198 et L6186), 1U d'ADN polymérase ainsi que 200ng de matrice (ADN génomique) dans un volume final de
 15 50ml.

A partir de ce produit PCR de 10kb dilué, une PCR nichée "env" ainsi qu'une PCR nichée "LTR" sont effectuées, afin d'objectiver la présence ou non d'un polymorphisme de ces deux régions. La dilution permet une amplification spécifique à partir du produit de LD-PCR et non du matériel génomique de départ. La PCR nichée
 20 "env" est réalisée grâce aux amorces U6189 et L6186, l'amorce U6189 étant celle employée pour la LD-PCR, l'amorce U6189 étant située en amont de l'ATG de *env*. La région U3 du LTR 5' est amplifiée par le couple d'amorce U6460 et L5643. L'amorce U6460 s'hybride en amont de la LTR 5' tandis que l'amorce L5643 s'hybride dans le domaine R de la LTR 5'. Les PCR nichées sont réalisées dans les conditions suivantes, 1
 25 x 5 min. à 94°C, 30 x (1 min. à 94°C, 1 min. à 53°C, 3 min. à 72°C), 1 x 7 min. à 72°C, en présence de tampon d'amplification (10 mM Tris HCL pH 8,3, 50mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,25mM de chaque dNTP, 330 nM de chaque amorce, 1,25U d'ADN polymérase, un aliquot du produit d'amplification de la LD-PCR, dans un volume final de 50ml

30

Analyse du polymorphisme:

Afin d'objectiver la présence ou non d'un polymorphisme, les produits des PCR nichés peuvent être analysés de différentes façons, en particulier le séquençage ou l'analyse par la technique SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) permettant de mettre en évidence la présence d'au moins une mutation entre deux séquences courtes d'une taille moyenne de 250pb.

Polymorphisme du gène *env*: l'utilisation de 20 amorces (10 amorces sens paires: 6302 à 6320 et 10 amorces anti-sens impaires: 6303 à 6321) permet le séquençage de la région codante de l'enveloppe à partir du produit PCR nichée enveloppe. Ces amorces peuvent également être utilisées pour une analyse du polymorphisme par SSCP. A titre d'exemple, les séquences des gènes d'enveloppe de trois donneurs sains étiquetés D6, D10 et D21 sont illustrées à la figure 2. Ces séquences montrent l'existence d'un faible taux de polymorphisme. Si on utilise la séquence d'enveloppe du donneur D6 comme référence arbitraire, la séquence de l'enveloppe du donneur D21 possède une mutation en position 386 (T386C), le remplacement de la thymine par la cytosine induisant un changement d'acide aminé de valine en alanine (V128A en numérotation protéique). De même, la séquence du gène de l'enveloppe du donneur D10 présente deux mutations par rapport à la séquence du donneur D6, en position 671 (T671C) et 920 (G920A), induisant deux changements d'acides aminés, respectivement de valine en alanine (V224A en numérotation protéique) et de sérine en asparagine (S306N en numérotation protéique). Ces séquences illustrent l'existence d'un polymorphisme. Le séquençage de 12 ADN de patients a été réalisé et nous a permis d'observer un faible taux de polymorphisme entre les ADN testés. Par exemple, la comparaison des séquences issues de deux individus notés 10 et 21 montre la présence de trois bases de différence en acides nucléiques sur les 1617 bases du gène, ce qui correspond à un taux de polymorphisme de 0,19%. Deux mutations sont situées sur la séquence de l'ADN 10 (T671C et G920A) et une sur la séquence de l'ADN 21 (T386C). La séquence de l'individu 6 sert de référence. Cette même analyse au niveau protéique permet d'observer 3 acides aminés mutés pour l'enveloppe entière comportant au total 538 acides aminés, soit un taux de polymorphisme de 0,56%. Les deux mutations de la séquence issue de l'individu 10 sont V224A et S306N et celle de la séquence issue de l'individu 21 est V128A.

Polymorphisme de la région promotrice U3 de la LTR5' associée au gène d'enveloppe: le séquençage du domaine U3 du LTR 5' est réalisé grâce aux 2 amorces précédemment utilisées pour la PCR nichée LTR. A titre d'exemple, les séquences de la région U3 de la LTR5' (associée au gène de l'enveloppe) de deux des donneurs sains (étiquetés D6 et D21) pour lesquels l'enveloppe a par ailleurs été séquencée sont illustrées à la figure 3. Ces séquences montrent l'existence d'un taux de polymorphisme plus important que pour le gène de l'enveloppe. On notera en particulier les variations aux positions 210 (T pour D6, C pour D21), 211 (G pour D6, A pour D21), 229 (A pour D6, G pour D21), 231 (T pour D6, C pour D21), 232 (C pour D6, A pour D21)

Les séquences des amorces utilisées pour la PCR, le SSCP et la séquençage sont illustrées dans le tableau III ci-dessous.

Tableau III

NOM :	SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES:
	Amorces PCR longue
U6198 :	5'- CAA-AAC-GCC-TGG-AGA-TAC-AGC-AAT-TAT-C-3'
L6186 :	5'- GCA-CCC-TCA-TGG-TTG-TGT-TAC-TTG-G-3'
	Amorces PCR nichée <i>env</i>
U6189 :	5'- CTG-AAA-ATC-CAG-GAG-ACA-ACG-CTA-GC-3'
L6186 :	5'- GCA-CCC-TCA-TGG-TTG-TGT-TAC-TTG-G-3'
	Amorces PCR nichée LTR 5'
U6460 :	5'- TTG-GTA-CCC-AAA-ACG-CCT-GGA-GAT-ACA-GCA-ATT-ATC-3'
L5643 :	5'- AAC-TCG-AGT-GAA-ATA-GCA-TGA-AAA-CAG-AG-3'
	Amorces SSCP et séquençage <i>env</i> :
U6302 :	5'- AGG-AAA-GTA-ACT-AAA-ATC-ATA-AAT-C-3'
L6303 :	5'- GGT-TCC-CTT-AGA-AAG-ACT-CC-3'
U6304 :	5'- AAT-ATT-GAT-GCC-CCA-TCG-TAT-A-3'
L6305 :	5'- CCA-GTT-TGG-GTG-AAG-TAA-GTC-3'
U6306 :	5'- GGA-GGA-CTT-GGA-GTC-ACT-GTC-3'
L6307 :	5'- AGG-CGA-GTA-TGG-GTA-CGG-AG-3'
U6308 :	5'- GGA-CTA-GAT-CTC-TCA-AAA-CTA-CA-3'
L6309 :	5'- ACG-GAA-GTG-GTG-TTT-ATT-TCT-G-3'
U6310 :	5'- CCT-GAA-CAA-TGG-AAC-AAC-TTC-3'
L6311 :	5'- ATT-CCT-GAG-GGT-AGG-CAG-AC-3'
U6312 :	5'- GGT-AAC-TCC-TCC-CAC-ACA-AA-3'
L6313 :	5'- GAA-TGG-GTA-CTC-TTT-TGT-TGC-3'
U6314 :	5'- TAC-AGT-TAT-GTC-ATA-TCT-AAG-CC-3'
L6315 :	5'- TAA-GTT-GAT-CTT-GCA-AGG-TGA-C-3'
U6316 :	5'- CTA-AAT-GGG-GAC-ATG-GAA-CG-3'
L6317 :	5'- TAT-TCG-ATC-TGG-AAT-TTC-TTC-AAC-3'
U6318 :	5'- CAA-TCC-GGA-ATC-GTC-ACT-GA-3'
L6319 :	5'- AGA-CAA-AGT-TAA-CAA-GGA-GGT-TC-3'
U6320 :	5'- ACT-CCT-CTT-TGG-ACC-CTG-TAT-C-3'
L6321 :	5'- GAG-GTT-GGC-CGA-CCA-CCG-3'

5 U fait référence à des amorces sens et L fait référence à des amorces réverses.

Exemple 3 :

Afin de déterminer le récepteur reconnu par la glycoprotéine d'enveloppe de HERV-W parmi les récepteurs connus comme étant exprimés dans les cellules humaines, c'est à dire PiT-2 (le récepteur des MLV amphotropes), PiT-1 (le récepteur des GALV -gibbon ape leukemia virus et FeLV-B -feline leukemia virus type B) et hATB^o (le récepteur des rétrovirus mammifères de type D également reconnu par le rétrovirus RD114), des tests d'interférence ont été réalisés. Pour cela, des cellules TELCeB6 ont été transfectées, soit avec le plasmide d'expression codant pour l'enveloppe HERV-W, soit avec le plasmide d'expression exprimant l'ARN messager anti-sens du gène codant pour l'enveloppe HERV-W, soit avec le plasmide d'expression codant pour un variant hyperfusogénique de l'enveloppe MLV amphotrope nommé ARless. Ces cellules, appelées "cellules productrices" ont ensuite été co-cultivées avec des cellules humaines, dites "cellules indicatrices", exprimant le récepteur de l'enveloppe HERV-W, et qui expriment, de plus, de manière stable, soit l'enveloppe du GALV, soit l'enveloppe du MLV amphotrope, soit l'enveloppe du RD114. L'expression des ces diverses glycoprotéines d'enveloppe sur ces cellules est capable de reconnaître les récepteurs correspondants, de les bloquer et donc de diminuer leur capacité à interagir avec une glycoprotéine d'enveloppe rétrovirale correspondante, mais exprimée de manière exogène, à la surface des cellules "productrices". Ainsi, si lors des tests de fusion par co-culture, on observe une diminution dans la formation de syncytia pour un type cellulaire indicateur bloquant un de ces récepteurs par comparaison à la cellule indicatrice parentale pour laquelle l'ensemble des trois récepteurs potentiels est pleinement accessible, on pourra en déduire la nature du récepteur reconnu par l'enveloppe exprimée sur la cellule productrice. Après deux jours de co-culture, les cellules ont été fixées, colorées, et les indices de fusion déterminés. Les résultats sont présentés dans le tableau IV ci-dessous.

Tableau IV

Protéine d'enveloppe exprimée dans les cellules productrices.	Protéines d'enveloppe exprimées dans les cellules indicatrices.			
	Témoin	MLV-A	GALV	RD114
Arless	+	-	+	+
anti-sens HERV-W	-	-	-	-
HERV-W	+	+	+	-

- signifie une absence de syncytia et + signifie la présence de syncytia

Témoin signifie qu'il n'y a pas de protéine d'enveloppe exprimée dans cette cellule.

5

Ces résultats permettent de déduire que la glycoprotéine d'enveloppe de HERV-W reconnaît le récepteur hATB^o des rétrovirus mammifères de type D. En effet, alors que cette enveloppe est fusogénique pour les cellules indicatrices parentales ou pour les cellules indicatrices exprimant, soit l'enveloppe MLV-A, soit l'enveloppe GALV, on n'observe pas de syncytia quand les cellules productrices exprimant la glycoprotéine d'enveloppe de HERV-W sont co-cultivée avec les cellules indicatrices exprimant l'enveloppe RD114.

10

<110> BIO MERIEUX

<130> Pouvoir fusogène de env de ERV-W

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver.. 2.1

<210> 1

<211> 538

<212> PRT "

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Leu Pro Tyr His Ile Phe Leu Phe Thr Val Leu Leu Pro Ser
25 1 5 10 15

Phe Thr Leu Thr Ala Pro Pro Pro Cys Arg Cys Met Thr Ser Ser Ser
20 25 30

30 Pro Tyr Gln Glu Phe Leu Trp Arg Met Gln Arg Pro Gly Asn Ile Asp
 35 40 45

Ala Pro Ser Tyr Arg Ser Leu Ser Lys Gly Thr Pro Thr Phe Thr Ala
50 55 60

His Thr His Met Pro Arg Asn Cys Tyr His Ser Ala Thr Leu Cys Met
65 70 75 80

His Ala Asn Thr His Tyr Trp Thr Gly Lys Met Ile Asn Pro Ser Cys
40 85 90 95

Pro Gly Gly Leu Gly Val Thr Val Cys Trp Thr Tyr Phe Thr Gln Thr
 100 105 110

5 Gly Met Ser Asp Gly Gly Gly Val Gln Asp Gln Ala Arg Glu Lys His
 115 120 125

Val Lys Glu Val Ile Ser Gln Leu Thr Arg Val His Gly Thr Ser Ser
 130 135 140

10 Pro Tyr Lys Gly Leu Asp Leu Ser Lys Leu His Glu Thr Leu Arg Thr
 145 150 155 160

His Thr Arg Leu Val Ser Leu Phe Asn Thr Thr Leu Thr Gly Leu His
 15 165 170 175

Glu Val Ser Ala Gln Asn Pro Thr Asn Cys Trp Ile Cys Leu Pro Leu
 180 185 190

20 Asn Phe Arg Pro Tyr Val Ser Ile Pro Val Pro Glu Gln Trp Asn Asn
 195 200 205

Phe Ser Thr Glu Ile Asn Thr Thr Ser Val Leu Val Gly Pro Leu Val
 210 215 220

25 Ser Asn Leu Glu Ile Thr His Thr Ser Asn Leu Thr Cys Val Lys Phe
 225 230 235 240

Ser Asn Thr Thr Tyr Thr Thr Asn Ser Gln Cys Ile Arg Trp Val Thr
 30 245 250 255

Pro Pro Thr Gln Ile Val Cys Leu Pro Ser Gly Ile Phe Phe Val Cys
 260 265 270

35 Gly Thr Ser Ala Tyr Arg Cys Leu Asn Gly Ser Ser Glu Ser Met Cys
 275 280 285

Phe Leu Ser Phe Leu Val Pro Pro Met Thr Ile Tyr Thr Glu Gln Asp
 290 295 300

40

Leu Tyr Ser Tyr Val Ile Ser Lys Pro Arg Asn Lys Arg Val Pro Ile
 305 310 315 320

5 Leu Pro Phe Val Ile Gly Ala Gly Val Leu Gly Ala Leu Gly Thr Gly
 325 330 335

Ile Gly Gly Ile Thr Thr Ser Thr Gln Phe Tyr Tyr Lys Leu Ser Gln
 340 345 350

10 Glu Leu Asn Gly Asp Met Glu Arg Val Ala Asp Ser Leu Val Thr Leu
 355 360 365

Gln Asp Gln Leu Asn Ser Leu Ala Ala Val Val Leu Gln Asn Arg Arg
 370 375 380

15 Ala Leu Asp Leu Leu Thr Ala Glu Arg Gly Gly Thr Cys Leu Phe Leu
 385 390 395 400

Gly Glu Glu Cys Cys Tyr Tyr Val Asn Gln Ser Gly Ile Val Thr Glu
 20 405 410 415

Lys Val Lys Glu Ile Arg Asp Arg Ile Gln Arg Arg Ala Glu Glu Leu
 420 425 430

25 Arg Asn Thr Gly Pro Trp Gly Leu Leu Ser Gln Trp Met Pro Trp Ile
 435 440 445

Leu Pro Phe Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ile Ile Leu Leu Leu Phe
 450 455 460

30 Gly Pro Cys Ile Phe Asn Leu Leu Val Asn Phe Val Ser Ser Arg Ile
 465 470 475 480

Glu Ala Val Lys Leu Gln Met Glu Pro Lys Met Gln Ser Lys Thr Lys
 35 485 490 495

Ile Tyr Arg Arg Pro Leu Asp Arg Pro Ala Ser Pro Arg Ser Asp Val
 500 505 510

40 Asn Asp Ile Lys Gly Thr Pro Pro Glu Glu Ile Ser Ala Ala Gln Pro

515

520

525

Leu Leu Arg Pro Asn Ser Ala Gly Ser Ser

530

535

5

<210> 2

<211> 2781

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgggagctg ttttcatgct atttcactct attaaatctt gcaactgcac tcttctggtc 60
 15 catgtttctt acggctcgag ctgagctttt gctcaccgtc caccactgct gtttgccacc 120
 accgcagacc tgccgctgac tcccatccct ctggatcctg cagggtgtcc gctgtgctcc 180
 tgateccagcg aggcgcccac tgccgctccc aattgggcta aaggcttgcc attgttcctg 240
 cacggctaag tgcttgggtt tgttctaatt gagctgaaca ctagtcaactg gggtccatgg 300
 ttctcttctg tgacccacgg cttctaataa aactataaca cttaccacat ggccaagat 360
 20 tccattcctt ggaatccgtg aggccaagaa ctccagggtca gagaatacga ggcttgccac 420
 catcttgga ggcgctgct accatcttgg aagtgggttca ccaccatctt gggagctctg 480
 tgagcaagga cccccggta acattttggc aaccacgaac ggacatccaa agtgatacat 540
 cctgggaagg accctaccca gtcattttat ctaccccaac tgcgggttaa gtggctggag 600
 tggagtcttg gatacatcac acttgagtca aatcctggat actgccaag gaacctgaaa 660
 25 atccaggaga caacgctagc tattcctgtg aacctctaga ggatttgctg ctgctcttca 720
 aacaacaacc aggaggaaag taactaaaat cataaatccc catggccctc ccttatcata 780
 tttttctctt tactgttctt ttacctctt tcaactctac tgcacccct ccatgccgct 840
 gtatgaccag tagtccctt taccaagagt ttctatggag aatgcagcgt cccggaaaata 900
 ttgatgcccc atcgtatagg agtctttcta aggaacccc caccttcaact gccacaccc 960
 30 atatgccccg caactgctat cactctgcca ctctttgcat gcatgcaaat actcattatt 1020
 ggacaggaaa aatgattaat cctagttgtc ctggaggact tggagtcaact gtctgttgga 1080
 cttacttcac ccaaactggt atgtctgatg ggggtggagt tcaagatcag gcaagagaaa 1140
 aacatgtaaa agaagtaatc tcccaactca cccgggtaca tggcacctct agcccctaca 1200
 aaggactaga tctctcaaaa ctacatgaaa ccctccgtac ccatactcgc ctggtaagcc 1260
 35 tatttaatac caccctcact gggctccatg aggtctcggc ccaaaacctt actaactggt 1320
 ggatatgect cccctgaac ttcaggccat atgtttcaat ccctgtacct gaacaatgga 1380
 acaacttcag cacagaaata aacaccactt ccgttttagt aggacctctt gtttccaatc 1440
 tggaaataac ccatacctca aacctcacct gtgtaaaatt tagcaatact acatacacia 1500
 ccaactccca atgcatcagg tgggtaaact ctccacaca aatagtctgc ctacctcag 1560
 40 gaatattttt tgtctgtggt acctcagcct atcgttggtt gaatggctct tcagaatcta 1620

	tgtgcttcct	ctcattctta	gtgcccccta	tgaccatcta	cactgaacaa	gattttataca	1680
	gttatgtcat	atctaagccc	cgcaacaaaa	gagtacccat	tcttcctttt	gttataggag	1740
	cgggagtgct	aggtgcacta	ggtactggca	ttggcggtat	cacaacctct	actcagttct	1800
	actacaaact	atctcaagaa	ctaaatgggg	acatggaacg	ggtcgccgac	tccctggtca	1860
5	ccttgcaaga	tcagcttaac	tccctagcag	cagtagtcct	tcaaaatcga	agagcttttag	1920
	acttgctaac	cgctgaaaga	gggggaacct	gtttattttt	aggggaagaa	tgctggttatt	1980
	atgttaatca	atccggaatc	gtcactgaga	aagttaaaga	aattcgagat	cgaatacaac	2040
	gtagagcaga	ggagcttcga	aacactggac	cctggggcct	cctcagccaa	tggtatgccct	2100
	ggattctccc	cttcttagga	cctctagcag	ctataatatt	gctactcctc	tttggaccct	2160
10	gtatctttta	cctccttggt	aactttgtct	cttcagaaat	cgaagctgta	aaactacaaa	2220
	tggagcccaa	gatgcagtcc	aagactaaga	tctaccgcag	acccctggac	cggcctgcta	2280
	gcccacgatc	tgatgttaat	gacatcaaag	gcacccctcc	tgaggaaatc	tcagctgcac	2340
	aacctctact	acgccccaat	tcagcaggaa	gcagttagag	cggtcgtcgg	ccaacctccc	2400
	caacagcact	taggttttcc	tggtgagatg	ggggactgag	agacaggact	agctggattt	2460
15	cctaggctga	ctaagaatcc	ctaagcctag	ctgggaaggt	gaccacatcc	acctttaaac	2520
	acggggcttg	caacttagct	cacacctgac	caatcagaga	gctcactaaa	atgctaatta	2580
	ggcaaagaca	ggaggtaaag	aaatagccaa	tcattctattg	cctgagagca	cagcaggagg	2640
	gacaatgate	gggatataaa	cccaagtctt	cgagccggca	acggcaaccc	cctttgggtc	2700
	ccctcccttt	gtatgggagc	tctgttttca	tgctatttca	ctctattaaa	tcttgcaact	2760
20	gcaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	a				2781

REVENDECATIONS

1. Procédé de détection de l'expression d'une protéine ou d'un polypeptide d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain, caractérisé en ce que la protéine ou le polypeptide présente une séquence polypeptidique qui comprend la séquence SEQ ID NO :1 ou un fragment de SEQ ID NO :1 ou une séquence présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1 ou avec un fragment de SEQ ID NO :1, et en ce qu'on détecte le pouvoir fusogène de ladite protéine ou dudit fragment dans des cellules d'un tissu cellulaire ou d'une culture cellulaire, par la mise en évidence de la formation de syncytia.

2. Procédé de détection de l'expression d'une protéine ou d'un polypeptide d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain, caractérisé en ce que la protéine ou le polypeptide présente une séquence polypeptidique présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1, et en ce qu'on détecte le pouvoir fusogène de ladite protéine dans des cellules d'un tissu cellulaire, ou d'une culture cellulaire par la mise en évidence de la formation de syncytia.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la protéine est codée par le gène *env* du rétrovirus endogène HERV-W.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la protéine est codée par un cadre de lecture ouvert situé sur le chromosome 7 du génome humain.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la protéine présente une séquence polypeptidique présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la protéine présente une séquence polypeptidique qui consiste en SEQ ID NO:1.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les cellules dudit tissu ou de ladite culture cellulaire sont choisies parmi les cellules osseuses, les cellules musculaires, les cellules placentaires, les cellules

endothéliales, en particulier des vaisseaux sanguins, les cellules épithéliales, les cellules gliales et les cellules tumorales ou issues de lignées cellulaires tumorales.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la détection du pouvoir fusogène de ladite protéine consiste à :

5 obtenir un vecteur d'expression de ladite protéine à partir duquel l'expression de la protéine ou de son gène est sous la dépendance d'un promoteur, de préférence un promoteur fort,

transfecter des cellules par le vecteur obtenu pour obtenir des cellules productrices, exprimant à leur surface ladite protéine, et

10 observer la formation de syncytia ou l'absence de formation de syncytia.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que la détection du pouvoir fusogène de la protéine consiste à :

obtenir un vecteur d'expression de ladite protéine à partir duquel l'expression de la protéine ou de son gène est sous la dépendance d'un promoteur, de
15 préférence un promoteur fort,

transfecter des cellules par le vecteur obtenu pour obtenir des cellules productrices, exprimant à leur surface ladite protéine,

co-cultiver des cellules naïves indicatrices exprimant à leur surface un récepteur de ladite protéine en présence desdites cellules productrices, et

20 observer la formation de syncytia ou l'absence de formation de syncytia.

10. Utilisation d'un gène ou d'un acide nucléique ou d'un fragment de gène ou d'un acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 ou 6, dans des conditions appropriées permettant son expression, pour préparer une composition thérapeutique ou
25 prophylactique.

11. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que ladite composition est destinée au traitement de cancers.

12. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en, ce que ladite composition est destinée à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta ou à
30 prévenir une déficience dans la formation naturelle de tout autre type de syncytia, ladite déficience étant associée à une pathologie.

13. Utilisation selon la revendication 10, 11 ou 12, caractérisée en ce que la composition est destinée à un traitement par thérapie génique.

14. Composition thérapeutique ou prophylactique comprenant un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 6,

15. Composition selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un promoteur hétérologue ou autologue, de préférence hétérologue, pour l'expression de ladite protéine ou dudit polypeptide.

10 16. Vecteur d'expression comprenant au moins un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 6, et des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte.

17. Cellule hôte comprenant au moins un vecteur selon la revendication 16.

15 18. Composition thérapeutique ou prophylactique comprenant au moins un vecteur d'expression selon la revendication 16.

19. Composition selon l'une quelconque des revendications 13, 14, 15, 17 et 18, caractérisée en ce qu'elle est destinée au traitement de cancers par destruction des cellules cancéreuses au moyen de la formation de syncytia.

20 20. Composition selon l'une quelconque des revendications 13, 14, 15, 17 et 18, caractérisée en ce qu'elle est destinée à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta ou à prévenir une déficience dans la formation naturelle de tout autre type de syncytia, ladite déficience étant associée à une pathologie.

25 21. Utilisation d'une protéine ou d'un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6 dans un vecteur de thérapie génique, ledit vecteur de thérapie génique comprenant, entre autres, une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6.

22. Vecteur de thérapie génique comprenant une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6.

23. Vecteur selon la revendication 22, choisi parmi un vecteur rétroviral de type MLV, un vecteur lentiviral pseudotypés par une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6, un vecteur synthétique.

24. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, un vecteur de
5 thérapie tel que défini dans l'une des revendications 22 et 23 et une séquence d'acide nucléique ou un oligonucléotide anti-sens.

25. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, un vecteur de thérapie tel que défini dans l'une des revendications 22 et 23 et un gène d'intérêt thérapeutique.

10 26. Cellule exprimant une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6.

27. Utilisation d'une cellule selon la revendication 26, comme vecteur cellulaire.

28. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, une cellule ou
15 vecteur cellulaire tel que défini dans les revendications 26 et 27.

29. Procédé pour la sélection de drogues ou substances médicamenteuses ou de systèmes gène/pro-drogue susceptibles d'intervenir qualitativement et/ou quantitativement sur le pouvoir fusogène d'une protéine ou d'un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6, selon lequel on met en contact
20 ladite drogue ou substance médicamenteuse ou ledit système gène/pro-drogue avec des cellules d'une culture cellulaire exprimant ladite protéine ou ledit polypeptide et, on observe une régression ou une disparition dans la formation de syncytia.

30. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, une séquence d'acide nucléique ou un oligonucléotide anti-sens susceptible de s'hybrider à un gène ou
25 un fragment de gène ou à un acide nucléique ou fragment d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6.

31. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, un ligand susceptible de reconnaître et de se lier au récepteur de la protéine définie en SEQ ID
30 NO :1.

32. Composition thérapeutique selon la revendication 31 comprenant au moins un ligand choisi parmi un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un anticorps transmembranaire ou un fragment desdits anticorps, une molécule inhibitrice, ledit ligand étant spécifique du récepteur de la protéine définie en SEQ ID NO : 1.

5 33. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, un gène d'intérêt thérapeutique, ledit gène codant pour un ligand tel que défini dans la revendication 32 et étant placé sous le contrôle des éléments nécessaires pour assurer son expression *in vivo*.

10 34. Vecteur de thérapie génique comprenant à sa surface le récepteur de la protéine identifiée en SEQ ID NO:1, notamment pour cibler des cellules produisant ladite protéine de façon constitutive ou induite.

La présente invention concerne en outre l'utilisation d'un gène ou d'un acide nucléique ou d'un fragment de gène ou d'un acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis précédemment dans la description des procédés objets de l'invention, dans des conditions appropriées permettant son expression, pour préparer une composition thérapeutique ou prophylactique.

Un autre objet de l'invention est une composition thérapeutique ou prophylactique comprenant un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis précédemment.

Une telle composition peut comprendre en outre un promoteur hétérologue ou autologue, de préférence hétérologue, pour l'expression de ladite protéine ou dudit polypeptide.

L'invention concerne aussi les objets suivants :

- un vecteur d'expression comprenant au moins un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis précédemment; et des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte ;
- une cellule hôte comprenant au moins un vecteur d'expression de l'invention, et
- une composition thérapeutique ou prophylactique comprenant au moins un vecteur d'expression ou une cellule hôte de l'invention.

Les différentes compositions thérapeutiques de l'invention sont en particulier destinée au traitement de cancers, tel que par destruction des cellules cancéreuses au moyen de la formation de syncytia. Les différentes compositions prophylactiques de l'invention sont aussi destinées à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta, ou à prévenir une déficience dans la formation naturelle de tout autre type de syncytia, ladite déficience étant associée à une pathologie.

Les compositions de l'invention thérapeutiques ou prophylactiques, telles que définies ci-dessus, sont avantageusement destinées à un traitement communément dénommé « traitement par thérapie génique » ou « traitement par transfert de gène ».

Comme énoncé ci-dessus, les propriétés fusogènes de la protéine Env HERV-W, du polypeptide Env HERV-W ou de leurs fragments tels que définis dans la

sélectionner des drogues ou substances médicamenteuses ou des systèmes gène/pro-drogue susceptibles d'intervenir qualitativement et/ou quantitativement sur leur pouvoir fusogène par mise en contact de ladite drogue ou substance médicamenteuse ou dudit système gène/pro-drogue avec des cellules d'une culture cellulaire exprimant ladite protéine ou ledit polypeptide et, observation d'une régression ou d'une disparition dans la formation de syncytia, étant entendu que la formation de syncytia à l'état naturel est associée à un état pathologique. A titre d'exemple, on peut citer les phénomènes hémorragiques, la destruction ou l'altération des cellules neuronales, la destruction ou l'altération exacerbée des ostéoblastes.

L'invention concerne aussi un procédé pour la sélection de drogues ou substances médicamenteuses ou de systèmes gène/pro-drogue susceptibles d'intervenir qualitativement et/ou quantitativement sur le pouvoir fusogène d'une protéine ou d'un polypeptide tel que défini précédemment. Selon ce procédé, on met en contact ladite drogue ou substance médicamenteuse ou ledit système gène/pro-drogue avec des cellules d'une culture cellulaire exprimant ladite protéine ou ledit polypeptide et, on observe une régression ou une disparition dans la formation de syncytia.

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins une séquence d'acide nucléique ou d'au moins un oligonucléotide anti-sens répondant aux critères définis précédemment et susceptible de s'hybrider et d'interférer spécifiquement avec la synthèse de la protéine Env HERV-W et une composition thérapeutique comprenant, entre autres, ladite séquence d'acide nucléique ou oligonucléotide anti-sens dans le but d'obtenir *in vivo* une régression ou une disparition de syncytia associés à un état pathologique.

Dans le but d'obtenir *in vivo* une régression de la formation de syncytia ou une disparition de syncytia associés à un état pathologique, on prépare une composition thérapeutique comprenant, entre autres, un ligand susceptible de reconnaître le récepteur identifié précédemment et d'inactiver ou inhiber le processus de formation de syncytia, ladite composition comprenant au moins un ligand choisi parmi un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un anticorps transmembranaire ou un fragment desdits anticorps ou une molécule inhibitrice, ledit ligand étant spécifique du récepteur de la protéine définie en SEQ ID NO:1, ou une composition comprenant un gène codant pour un ligand susceptible de s'exprimer *in vivo* dans une cellule cible ou dans un tissu cellulaire cible déterminé, ledit gène étant sous la dépendance des éléments nécessaires assurant son expression, après son transfert dans la cellule ou le tissu cellulaire cible.

13. Utilisation selon la revendication 10, 11 ou 12, caractérisée en ce que la composition est destinée à un traitement par thérapie génique.

14. Composition thérapeutique ou prophylactique comprenant un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 6,

15. Composition selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un promoteur hétérologue ou autologue, de préférence hétérologue, pour l'expression de ladite protéine ou dudit polypeptide.

16. Vecteur d'expression comprenant au moins un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 6, et des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte.

17. Cellule hôte comprenant au moins un vecteur selon la revendication 16.

18. Composition thérapeutique ou prophylactique comprenant au moins un vecteur d'expression selon la revendication 16.

19. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 14, 15 et 18, caractérisée en ce que ladite composition est destinée au traitement de cancers par destruction des cellules cancéreuses au moyen de la formation de syncytia.

20. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 14, 15 et 18, caractérisée en ce que ladite composition est destinée à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta ou à prévenir une déficience dans la formation naturelle de tout autre type de syncytia, ladite déficience étant associée à une pathologie.

21. Utilisation d'une protéine ou d'un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6 dans un vecteur de thérapie génique, ledit vecteur de thérapie génique comprenant, entre autres, une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6.

22. Vecteur de thérapie génique comprenant une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6.

13. Utilisation selon la revendication 10, 11 ou 12, caractérisée en ce que la composition est destinée à un traitement par thérapie génique.

14. Composition thérapeutique ou prophylactique comprenant un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 6,

15. Composition selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un promoteur hétérologue ou autologue, de préférence hétérologue, pour l'expression de ladite protéine ou dudit polypeptide.

16. Vecteur d'expression comprenant au moins un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 6, et des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte.

17. Cellule hôte comprenant au moins un vecteur selon la revendication 16.

18. Composition thérapeutique ou prophylactique comprenant au moins un vecteur d'expression selon la revendication 16.

19. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 14, 15 et 18, pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement de cancers par destruction des cellules cancéreuses au moyen de la formation de syncytia.

20. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 14, 15 et 18, pour l'obtention d'un médicament destiné à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta ou à prévenir une déficience dans la formation naturelle de tout autre type de syncytia, ladite déficience étant associée à une pathologie.

21. Utilisation d'une protéine ou d'un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6 dans un vecteur de thérapie génique, ledit vecteur de thérapie génique comprenant, entre autres, une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6.

22. Vecteur de thérapie génique comprenant une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6.

[illegible]

[illegible]

Consensus	CTCAGCCCAAT	GGATGCCCTG	GATTCTCCCC	TTCTTAGGAC	CTCTAGCAGC	TATAATATTTG	CTACTCCTCT	TTGGACCCCTG	TAATCTTTAAC	CTCCTTGTGA	ACTTTGTCTC	TTCCAGAAATC	1440
Env ADN 6	1440
Env ADN 10	1440
Env ADN 21	1440
Consensus	GAACCTGTAA	AACACAAAT	GGAGCCCAAG	ATGCAGTCCA	AGACTAAGAT	CTACCGCAGA	CCCCGTGGACC	GGCCTECTAG	CCCACGATCT	GAATGTTAATG	ACATCAAAGG	CACCCCTCCT	1560
Env ADN 6	1560
Env ADN 10	1560
Env ADN 21	1560
Consensus	GAGGAATCT	CAGCTGCACA	ACCTCTACTA	CGCCCCAATT	CAGCAGGAAG	CAGTTAG							1617
Env ADN 6							1617
Env ADN 10							1617
Env ADN 21							1617

Consensus	TCGAGAGACAG GACTAGCTGG ATTCTCTAGG CGGACTAAGA ATCCCTAAGC CTAGCTGGGA ARGTCAGCCAC GTCCACCTTT AAACACGGGG CTTCGAAC TT	100
LTR6 c1A	100
LTR21 c1S G..... A.....	100
Consensus	AGCTCACACC TGACCAATCA GAGAGTCAC TAAATGCTA ATTAGGC1AA GACGCGAGGT AAAGAARTAG CCATCATCT ATTGCCTGAG AGCAGACGAG	200
LTR6 c1A	200
LTR21 c1S A..... G.....	200
Consensus	GAGGACAAAY RATCGGGATA TAAACCCARG YMTTCGAGCY GGCAC	246
LTR6 c1A T G..... A. TC..... C.....	246
LTR21 c1S C A..... G. CA..... T.....	246

FIG. 4

FIGURE 4

